

Отзыв официального оппонента

Усачева Константина Сергеевича на диссертационную работу Барашковой Анны Сергеевны «Изучение структурного разнообразия и биологической активности защитных пептидов из семян нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.)», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9. - Биоорганическая химия

Актуальность исследования

Антимикробные пептиды (АМП) растений представляют собой важный компонент врожденного иммунитета и рассматриваются как перспективная основа для создания новых биопестицидов и лекарственных препаратов. Семена нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.) известны богатым набором биологически активных веществ, однако комплекс защитных пептидов этого растения до настоящего времени был изучен фрагментарно. Диссертационная работа Барашковой А.С. направлена на выделение, оценку структурного разнообразия и исследования спектра биологической активности защитных пептидов семян нигеллы посевной (*Nigella sativa* L.), что имеет большое значение как для фундаментальной биоорганической химии, так и для практических разработок в области защиты растений и биомедицины. Актуальность темы не вызывает сомнений.

Структура диссертации

Диссертационная работа Барашковой А.С. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 165 страницах машинописного текста. Включает 45 рисунков и 16 таблиц. Список цитируемой литературы включает 372 источника на русском и английском языках.

Научная новизна и практическая значимость

В ходе работы автором впервые охарактеризован комплекс защитных пептидов, одновременно присутствующих в семенах одного растения *N. sativa*. Выделено 15 индивидуальных пептидов, из которых 10 являются новыми. Впервые экспериментально подтвержден биосинтез 9 высокомолекулярных тионинов с 8-цистеиновым мотивом (нигеллотиионинов) в рамках одного растения, что является уникальным для данного семейства АМП. Для одного из тионинов – NsW2 – детально изучен механизм мембраноактивного действия, включая образование пор в искусственных липидных бислоях, имитирующих мембраны микроорганизмов. Показана выраженная антифунгальная и цитотоксическая активность NsW2, определены минимальные ингибирующие концентрации в отношении клинических изолятов *Aspergillus* и дрожжей, которые были получены от пациентов с осложненным течением туберкулеза легких. Установлено, что нигеллотиионин NsW2 обладает цитотоксическими свойствами по отношению к нормальным и опухолевым (линии клеток меланомы мыши (B16) и аденокарциномы человека (HTC-116)) клеткам млекопитающих.

Практическая значимость работы состоит в разработке оптимизированной схемы выделения АМП из растительного сырья, а также в получении рекомбинантного гибридного белка Trx-NsW2, проявляющего фунгистатическое действие и ростостимулирующий эффект на культурные растения в условиях искусственного заражения. Полученные результаты создают основу для создания прототипов биопестицидов и регуляторов роста растений нового поколения.

Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенности

Диссертационная работа А.С. Барашковой по своей структуре и качеству изложения материала соответствует стандартам.

Во **Введении** обосновывается выбор темы и объектов исследования, сформулирована актуальность и научная значимость, формулируются цель и задачи исследования, результаты

и положения, выносимые на защиту, их научная новизна, перечислены методы исследования, данные об апробации результатов, отмечен личный вклад автора.

В **Главе 1**, являющейся обзором литературы приведен подробный анализ современных представлений о классификации, структуре и функциях растительных АМП, с особым акцентом на семейства тионинов, дефензинов и неспецифических липид-переносящих белков. Обзор написан грамотно, иллюстрирован схемами и отражает понимание автором современного состояния области. В целом обзор современной литературы демонстрирует уровень сложности материала, с которым столкнулся автор. Текст главы сопровождается большим количеством ссылок и качественных иллюстраций, что отражает понимание автором современного состояния области исследования.

В **Главе 2** детально описаны экспериментальные подходы, которые использовались для решения поставленных задач. Согласно представленным данным, можно сделать вывод о широком и современном наборе методов, применяемых автором, что также свидетельствует о высоком профессиональном уровне исследователя. Особо стоит отметить мультидисциплинарность и разнообразность в применении экспериментальных подходов: экстракция и хроматографическое разделение (аффинная, ионообменная, обращенно-фазовая ВЭЖХ), масс-спектрометрия, N-концевое секвенирование, флуоресцентная микроскопия, электрофизиологические методы на искусственных мембранах, методы гетерологической экспрессии. подача материала выполнена лаконично и доступно для специалистов из разных областей, но при этом описание всех методик дано таким образом, что возможно их воспроизведение или использование в качестве лабораторного протокола.

В третьей **главе** приведены основные результаты исследования. Автором последовательно охарактеризованы выделенные дефензины (новый NsD4), нсЛПБ (NsLTP2, NsLTP3) и группа из девяти тионинов. Показана высокая степень гомологии нигеллотионинов с тионинами злаков, а также их филогенетическая обособленность. Изучена антимикробная активность NsLTP3 и нигеллотионинов; для NsW2 детально исследованы кинетика роста *Aspergillus niger*, повреждение конидий и образование пор в модельных мембранах. Отдельный блок посвящен получению рекомбинантного гибридного белка Trx-NsW2, который, в отличие от нативного пептида, не проявлял прямого антифунгального действия, но вызывал депигментацию конидий и оказывал иммуномодулирующий эффект на растениях ячменя и кресс-салата.

В **Главе 4** автором приведено обобщение полученных результатов работы. Особый интерес представляет интерпретация мембраноактивного механизма NsW2 с привлечением данных электрофизиологии и конфокальной микроскопии, а также обсуждение возможных путей реализации активности гибридного белка. Выводы и положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Результаты диссертационной работы апробированы на международных и всероссийских конференциях, опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, индексируемых базами данных Web Of Science и Scopus.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации составлен в соответствии с общепринятой структурой и соответствует установленным нормам. В нем точно и достоверно представлены результаты проведенных исследований, а также предоставляется полное представление о содержании диссертации и уровня участия автора в этих исследованиях. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Замечания к диссертационной работе

К работе нет вопросов принципиального характера, которые повлияли на общую высокую оценку уровня проведенных исследований и достоверности полученных результатов, однако есть несколько замечаний:

1. Из семян *N. sativa* выделено 9 высокоомологичных тионинов с 8-цистеиновым мотивом. Чем, по данным моделирования, отличаются пространственные структуры

NsW2 и NsW4 (имеющих замену Met19Ile)? Как эта замена, локализованная в β -повороте между двумя α -спиралями, может влиять на стабильность Г-образной укладки и на биологическую активность?

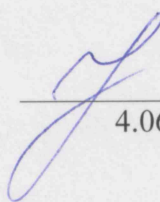
2. В электрофизиологических экспериментах показано образование одиночных пор только в бислоях, содержащих анионные фосфолипиды (DOPS, DOPG) и эргостерол, но не в чистом DOPC. Можно ли объяснить эту селективность с точки зрения различия в пространственном строении пептидов? Какие именно аминокислотные остатки нигеллотионина NsW2, по аналогии с α -гордотионином, ответственны за связывание с фосфатидилсерином и формирование устья поры?
3. Для NsW2 была показана цитотоксичность как для опухолевых, так и для нормальных клеток, причём дозозависимость различается для разных линий. Существуют ли структурные предпосылки для избирательного повреждения мембран опухолевых клеток (например, различия в экспозиции фосфатидилсерина, которые могут усиливать связывание катионного пептида)? Может ли пептид проникать внутрь клетки и взаимодействовать с ДНК (учитывая вызванную им конденсацию хроматина)?
4. В тексте встречаются стилистические неточности и единичные опечатки.

Высказанные замечания не затрагивают основных положений, защищаемых автором, и не снижают ценности проведенного исследования и высокого качества представленной диссертационной работы. Диссертация производит впечатление законченного исследования, основанного на объемной и тщательно выполненной экспериментальной и теоретической работе.

Заключение

По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности и обоснованности научных результатов диссертационная работа Барашковой Анны Сергеевны полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биорганическая химия.

Официальный оппонент:
доктор физико-математических наук,
заведующий лабораторией структурного анализа
биомакромолекул
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр Российской академии
наук»
Усачев Константин Сергеевич


4.06.2026

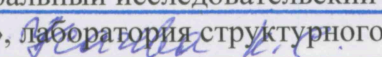
Контактные данные:

тел.: 7(843)2927597, e-mail: k.usachev@knc.ru

Адрес места работы:

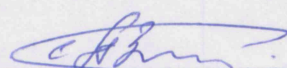
420111, Российская Федерация, Татарстан, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31,

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», лаборатория структурного анализа биомакромолекул

Подпись 
ЗАВЕРЯЮ

Заместитель директора по научной работе

ФИЦ КазНЦ РАН

Зиганшина С.А. 

« 05 » 06 20 26 г.

